

1/34/8 (Item 4 from file: 351)

003706377

WPI Acc No: 1983-702559/198327

NAD(p) dependent cholesterol dehydrogenase prepn. - by  
cultivating Nocardia Alcaligenes or Proteus microorganism aerobically and  
recovering prod.

Patent Assignee: AMANO PHARM KK (AMAN )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

| Patent No   | Kind | Date     | Applicat No | Kind | Date     | Week   |
|-------------|------|----------|-------------|------|----------|--------|
| JP 58089183 | A    | 19830527 |             |      | 198327   | B      |
| JP 90018064 | B    | 19900424 | JP 81186183 | A    | 19811119 | 199020 |

Priority Applications (No Type Date): JP 81186183 A 19811119

Patent Details:

| Patent No | Kind | Lan Pg | Main IPC | Filing Notes |
|-----------|------|--------|----------|--------------|
|-----------|------|--------|----------|--------------|

|             |   |   |  |  |
|-------------|---|---|--|--|
| JP 58089183 | A | 9 |  |  |
|-------------|---|---|--|--|

Abstract (Basic): JP 58089183 A

<http://www.dialogweb.com/cgi/dwclient?req=1143736480348>

3/30/2006

Prodn. of NAD(P) dependent cholesterol dehydrogenase (NAD(P)-CDH) comprises cultivating a microorganism of Nocardia (specific: Nocardia sp.No.Ch 2-1, FERM-P 6217), Alcaligenes (Alc.sp.No.4, FERM-P 6216) or Proteus (Proteus vulgaris IAM 1025) which grows under aerobic conditions, and recovering NAD(P)-CDH from the culture broth.

The microorganism may be incubated in a medium contg. nitrogen source (peptone, yeast extract, (NH4)2SO4), carbon source (glucose, glycerol) and mineral. Addn. of cholesterol to the medium increases the yield of NAD(P)-CDH. In recovering NAD(P)-CDH, the cultured broth or organism extract is treated by salting-out or pptn. with Me2CO and EtOH. The resulting crude enzyme may be purified by ion-exchange chromatography or molecular sieve chromatography.

NAD(P)-CDH is useful as a reagent used in quantitative analysis of cholesterol. For example, the reagent consists of 0.1-10 unit DAD(P)-CDH, 10-100 mM NAD(P), less than 1.0% Triton 100, and 0.1-10 unit cholesterol esterase.

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): C12N-009/04; C12R-001/05

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2006 Thomson Derwent. All rights reserved.

SOURCE: (C) WPI / DERWENT

XP 2044527

AN : 83-702559 [27]

MC : B04-B02C2 B12-K04 D05-C03

PN : JP58089183 A 830527 DW8327 009pp  
- JP2018064B B 900424 DW9020 000pp

PR : JP810186183 811119

PA : (AMAN ) AMANO PHARM KK

DC : B04 D16

IC : C12N9/04 ;C12R1/05

TI : NAD(p) dependent cholesterol dehydrogenase prep. - by cultivating Nocardia Alcaligenes or Proteus microorganism aerobically and recovering prod.

AB : J58089183 Prodn. of NAD(P) dependent cholesterol dehydrogenase (NAD(P)-CDH) comprises cultivating a microorganism of Nocardia (specific: Nocardia sp. No. Ch 2-1, FERM-P 6217), Alcaligenes (Alc. sp. No. 4, FERM-P 6216) or Proteus (Proteus vulgaris IAM 1025) which grows under aerobic conditions, and recovering NAD(P)-CDH from the culture broth.

- The microorganism may be incubated in a medium contg. nitrogen source (peptone, yeast extract, (NH4)2SO4), carbon source (glucose, glycerol) and mineral. Addn. of cholesterol to the medium increases the yield of NAD(P)-CDH. In recovering NAD(P)-CDH, the cultured broth or organism extract is treated by salting-out or pptn. with Me2CO and EtOH. The resulting crude enzyme may be purified by ion-exchange chromatography or molecular sieve chromatography.
- NAD(P)-CDH is useful as a reagent used in quantitative analysis of cholesterol. For example, the reagent consists of 0.1-10 unit NAD(P)-CDH, 10-100 mM NAD(P), less than 1.0% Triton 100, and 0.1-10 unit cholesterol esterase.

⑨ 日本国特許庁 (JP)  
⑩ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開  
昭58-89183

⑫ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 N 9/04  
//(C 12 N 9/04  
C 12 R 1/365)  
(C 12 N 9/04  
C 12 R 1/05)  
(C 12 N 9/04  
C 12 R 1/37)

識別記号  
7236-4B

⑬ 公開 昭和58年(1983)5月27日  
発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 9 頁)

⑭ NAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素の製造法

⑮ 特 願 昭56-186183  
⑯ 出 願 昭56(1981)11月19日

⑰ 発明者 秋葉哲典  
岐阜県可児郡可児町愛岐ヶ丘1  
-165  
⑱ 出願人 天野製薬株式会社  
名古屋市中区錦一丁目2番7号

明細書

1. 発明の名称

NAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素の製造法

2. 特許請求の範囲

1. 好気的条件下で生育する微生物を培養し培養物からNAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素を採取することを特徴とするNAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素の製造法。

2. 好気的条件下で生育する微生物がノカルジア属、アルカリゲネス属、プロテウス属のうちのいずれかに属する菌株である特許請求の範囲第1項記載のNAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素の製造法。

3. ノカルジア属に属する菌株がノカルジア sp. N Ch 2-1 (Nocardia sp. N Ch 2-1) F ERM-PN6217 である特許請求の範囲第2項記載のNAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素の製造法。

4. アルカリゲネス属に属する菌株がアルカリ

ゲネス sp. No 4 (Alcaligenes sp. No 4) FER M-PN6216 である特許請求の範囲第2項記載のNAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素の製造法。

5. プロテウス属に属する菌株がプロテウス・ブルガリス IAM1025 (Proteus vulgaris I AM1025) である特許請求の範囲第2項記載のNAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、NAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素 (Cholesterol dehydrogenase: 以下「NAD (P)-CDH」と略す) に関する。さらに詳しく説明すると。微生物を好気的条件下で培養し、その菌体もしくは培養液からNAD (P)-CDHを採取する方法に関する。

本発明方法により得られたNAD (P)-CDHは、コレステロールの定量法およびコレステロールの定量用試薬として有用である。ここでいうNAD (P)-CDHとは、補酵素としてNAD (ニコチン

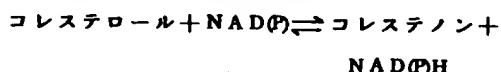
アミドアデニン、ジヌクレオチド)、NADP(ニコチンアミドアデニン、ジヌクレオチドリン酸)を要求し、電子供与体(コレステロール)から水素をうばい、電子受容体(NAD又はNADP)に付加する反応を触媒する酵素をいう。

従来好気性微生物が、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールデヒドロターゼを生産することは既に知られている。また、ノカルジア・エリスロポリスがコレステロールの酸化を触媒する酵素を生産するとの報告(Ann. Clin. Biochem., 10巻、79頁、1973年)がある。この酵素の場合は、NAD(P)への依存性は認められない。また、マイコバクテリウム・コレステリカム(J. Biol. Chem., 206巻、511頁、1953年)、プレビバクテリウム・ステロリカム(特公昭48-1190)についても同様のことといえる。さらには、絶対嫌気性微生物である、オイバクテリウムsp. ATCC21408がNAD(P)-CDHを生産するとの報告(特開昭53-56090)もあるが、酵素学的性質等の記載はほとんどなされていないばかり

か、NAD(P)依存性の記載があるにもかかわらず、NAD(P)の存在なしにも反応が進行する例が記載されている。したがってこの酵素は、本発明でいうところのNAD(P)依存性脱水素酵素とはいえない。

従来酵素によるコレステロールの定量は、コレステロールオキシダーゼを使用する方法が広く用いられているが、発色系に導くためにパーオキシダーゼ等が必要であり、操作が繁雑である。しかも血中のビリルビン、アスコルビン酸等により影響をうけ、これにより誤差が生じやすいという欠点を有している。

コレステロールの定量において、NAD(P)の存在なしには反応が進行しないNAD(P)-CDHを用い、下記反応式に示される反応により生ずるNAD(P)Hを直接光度計で測定できれば、操作が簡単であり、前記のコレステロールオキシダーゼを用いる方法の種々の問題も解決される。



本発明者等は、上記反応に通した酵素すなわち、コレステロールに特異性が高く、NAD(P)依存性である脱水素酵素を広く自然界に求めたところ、意外にも好気的条件下に生育する微生物が、著量のNAD(P)-CDHを生産することを見い出した。その中で、特に優れた菌株として、ノカルジアsp. No Ch 2-1(Nocardia sp. No Ch 2-1)、アルカリゲネスsp. No 4 (Alcaligenes sp. No 4)、およびプロテウス・ブルガリス IAM1025 Proteus vulgaris IAM1025 が例示される。

次にノカルジアsp. No Ch 2-1およびアルカリゲネスsp. No 4 の菌学的性質を以下に述べる。

(1) ノカルジアsp. No Ch 2-1(Nocardia sp. No Ch 2-1)の菌学的性質

(A) 形態的性質

- 1) 細胞の形および大きさ：培養初期菌糸状に生育し分枝を生じる。その後、不規則な分断が生じ細胞は桿菌状となる。大きさは0.8~1.0μ×1.5~4.0μ位である。気菌糸を形成せず胞子のう

胞子も形成しない。

- 2) グラム染色性：陽性
- 3) 抗酸性：陽性
- 4) 運動性：無し

(B) 化学的組成分析

細胞壁中に meso-ジアノビメリン酸、アラビノース、ガラクトースが含まれ、ジアミノビメリン酸、グリシンは含まない。

(C) 各培地における生育状態

- 1) 肉汁寒天平板培地：30°Cで4日培養後、直徑0.5~1.0mmの円形コロニーを形成する。周辺は全縁もしくは波状である。表面は平滑で半球状であり、中心部が凸状に隆起する場合もある。色調は薄いクリーム色で不透明である。培地中に色素は出さない。
- 2) シュークロース硝酸塩寒天培地  
生育中程度で集落の色は白色ないし薄クリーム色である。水溶性色素は出さない。
- 3) グルコース、アスパラギン寒天培地

生育中程度で集落の色はクリーム色である。水溶性色素は出さない。

4) グリセリン、アスパラギン寒天培地  
生育中程度で集落の色は白色ないし薄クリーム色である。水溶性色素は出さない。

5) スターチ無機塩寒天培地  
生育中程度で集落の色は白色ないし薄クリーム色である。水溶性色素は出さない。

6) チロシン寒天培地  
生育中程度で集落の色は白色ないし薄クリーム色である。水溶性色素は出さない。

7) 栄養寒天培地  
生育良好で集落の色はクリーム色である。水溶性色素は出さない。

8) イースト麦芽寒天培地  
生育良好で集落の色はクリーム色である。水溶性色素は出さない。

9) オートミール寒天培地  
生育中程度で集落の色は白色ないし薄クリーム色である。水溶性色素は出さない。

## ④ 生理的性質

1) 生育温度: 15°C ~ 43°C で生育する。  
10°C, 45°C で生育しない。  
最適温度は 30 ~ 35°C である。

2) 硝酸塩還元性: 陽性

3) カタラーゼ: 陽性

4) オキシダーゼ: 陰性

5) ウレアーゼ: 陽性

6) デンプン加水分解: 陰性

7) ゼラチン液化: 陰性

8) チロシン加水分解: 陰性

9) カゼイン加水分解: 陰性

10) キサンチン加水分解: 陰性

11) DNA の分解: 陰性

12) リトマスミルク: アルカリ性、ペプトン化、凝固共にしない。

13) メラニン様色素の生成: 無し

14) エスクリン加水分解: 陽性

15) Tween 20, 40, 60, 80 加水分解: すべて

て陽性

16) ベニシリン耐性試験: 耐性

17) 酸素に対する態度: 好気性

18) 無機窒素源の利用: アンモニウム塩、硝酸塩共に利用する。

19) NaCl 生育範囲: 0 ~ 6% で生育する。  
7% で生育しない。

20) 各種炭素源の同化性 (ブリドハム、ゴドリーブ寒天培地)  
D-グルコース、D-フランクトース、  
マンノース、グリセリン、トレハロースを同化する。  
L-アラビノース、D-キシロース、サッカロース、イノシット、L-ラムノース、ラフィノース、  
D-ガラクトース、D-マンニット、  
マルトース、ソルビットを同化しない。

21) 各種糖から酸の生成  
D-グルコース、マンノース、D-フランクトース、トレハロース、グリセリンから酸を生成する。  
L-アラビノースから酸を生成する。

ス、D-キシロース、D-ガラクトース、マルトース、サッカロース、ラクトース、D-ソルビット、D-マンニット、イノシット、デンプンから酸を生成しない。

以上の菌学的性質を Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版を参考に検討した結果、細胞壁中に meso-ジアミノビメリノ酸、アラビノース、ガラクトースを含み、D-ジアミノビメリノ酸、グリシンが含まれないこと、好気性で菌糸状によく生育し、後に分断して菌状となること、抗酸性であること、胞子のう胞子および気菌糸を着生しないこと等から本菌は Nocardia に属する菌である。

よって本菌は、本発明者らがノカルジア sp. No. Ch 2-1 (Nocardia sp. No Ch 2-1) と命名し、工業技術院微生物工業技術研究所に菌寄第6217号 (FERM-PNo6217) にて寄託されている。

(2) アルカリゲネス sp. No 4 (Alcaligenes sp. No 4) の菌学的性質

## (A) 形態

- 1) 細胞の形および大きさ:  $0.4 \sim 0.6 \mu \times 0.8 \sim 1.2 \mu$  の菌である。
- 2) 細胞の多形性の有無: 多形性は認められない。
- 3) 運動性の有無: 周鞭毛を有し運動する。
- 4) 孢子の有無: 孢子は形成しない。
- 5) グラム染色性: 陰性
- 6) 抗酸性: 陰性

## (B) 各培地における生育状態

## 1) 肉汁寒天平塗培養

円形ローニーで表面は平滑、半レンズ状の隆起、全縁状で薄クリーム色、半透明、光沢あり

## 2) 肉汁寒天斜面培養

生育中程度、糸状に生育、薄クリーム色で半透明

## 3) 肉汁液体培養

菌膜をつくらない、やや渦り沈も少しある。

## 13) カタラーゼ: 陽性

## 14) 生育範囲 PH: PH 5.0 ~ 10.0 で生育する。温度: 5°C ~ 37°C で生育する。42°C で生育しない。

## 15) 酸素に対する態度: 好気性

## 16) OF テスト (Hugh-Leifson 法): フラクトースから好気的に酸を生成する。

## 17) 糖類から酸およびガスの生成の有無

Ayers, Rupp and Johnson 培地でフラクトースとグリセリンから酸を生成するかガスは生成しない。

アラビノース、キシロース、グルコース、マンノース、ガラクトース、麦芽糖、シ・糖、乳糖、トレハロース、ソルビット、マンニット、イノシット、デンプンからは酸もガスも生成しない。

## 18) 独立栄養的生育: 水素ガス、炭酸ガス、酸素ガスを含有する気体中で生育しない。

## 19) Tween 80 の分解性: 陽性

- 4) 肉汁ゼラチン穿刺培養: ゼラチンは液化しない。
- 5) リトマスマルク培養: アルカリ性になるがペプトン化しない、凝固しない。

## (C) 生理的性質

- 1) 硝酸塩の還元: 陽性
- 2) 脱窒反応: 陰性
- 3) MR テスト: 陰性
- 4) VR テスト: 陰性
- 5) インドールの生成: 陰性
- 6) 硫化水素の生成: 弱陽性
- 7) デンプン加水分解: 陰性
- 8) クエン酸塩の利用: Koser の培地と Christensen の培地で共に利用する。
- 9) 無機窒素源の利用: 硝酸塩およびアンモニウム塩を利用する。
- 10) 色素の生成: 水溶性色素を生成しない。
- 11) ウレアーゼ: 陽性
- 12) オキシダーゼ: 陽性

## 20) 賚化性: D-フランクトース、L-フュニルアラニン、レブリン酸カルシウム、L-スレオニンを賚化する。マンノース、マルトース、マンニット、ベタインを賚化しない。

以上の菌学的諸性質から Bergey's manual of Determinative Bacteriology (第8版) の記載に照合して検討すると短桿菌で周鞭毛により運動すること、グラム陰性、好気性であること、栄養要求性はなく、アンモニウム塩、硝酸塩を利用すること、カゼインおよびゼラチンを分解しないこと、オキシダーゼ陽性であること等から Alcaligenes 属に分類される。

種については、文献①②③を参考に検討したところ *A. paradoxus*, *A. muklandii*, *A. eutrophus*, *A. paradoxus-trichomondii*, *A. later*, *A. gracilis* とは主に独立栄養的生育の点で異なる。また *A. paradoxus* とは主に 42°C における生育、D-フランクトースの賚化性で、*A. aguamarinus* とは、主にデンプンの分解性、マルトースの賚化性で、*A. pacificus* とは、主にスレオニン、ベ

タインの質化性で、*A. cupidus* とは、主にオキシダーゼおよびマンニット、マンノースの質化性で、*A. venustus* とは、主にレブリン酸塩、スレオニン、ベタインの質化性で、*A. seatus* とは、主にマンニット、スレオニン、フェニルアラニンの質化性で異なる。よって本菌をアルカリゲネス sp. No 4 (*Alcaligenes* sp. No 4) と命名し工業技術院微生物工業技術研究所に菌寄第 6216 号 (FERM-PNo 6216) として寄託されている。

次にこれらの菌を用いて NAD(P)-CDH を製造する方法について詳述する。これらの菌はいづれも構成的に NAD(P)-CDH を生産する能力を有し、通常のペプトン、酵母エキス、又は硫酸アンモニウム等のチッソ源及びグルコース、グリセロール等の炭素源、その他無機塩等を含有する培地でも NAD(P)-CDH を生産するが、コレステロールを培地に添加することによりさらに多量に NAD(P)-CDH を生産する。この際コレステロールの添加は、培養開始時あるいは途中からのいずれでもよい。また、その他培養条件に関しては、

通常行なわれる範囲で実施できる。これらの菌により生産された NAD(P)-CDH は、菌体のみならず、培養液中にも蓄積され、その何れからでも酵素を回収することができる。これらの培養液又は菌体抽出液を硫酸アンモニウム等による塩析又は、アセトン、エタノール等の溶剤沈澱して得た粗酵素は、そのままコレステロールの定量に使用するか、あるいは更に精製して使用することもできる。例えば精製については、イオン交換クロストグラフィー、分子篩クロストグラフィー等公知の方法により可能である。

ここで得られる NAD(P)-CDH は、コレステロール含有物質中のコレステロール定量等に有利に使用できる。

本発明に使用する NAD(P)-CDH の活性測定法を以下に示す。

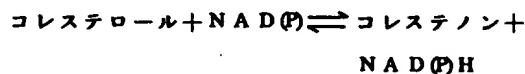
NAD(P)-CDH の酵素活性は、コレステロールと NAD(P) を基質として反応した場合の NAD(P)H の生成量を、340 nm における吸光度の増加として、分光光度計で測定し算出する。すなわち、

0.1 M トリス・塩酸緩衝液 (PH 8.6) 2.65 ml、  
28 mM MNAD 溶液 0.1 ml、(8% トリトン X-  
100 溶液 0.15 ml)、1% コレステロール溶液  
0.05 ml 及び NAD(P)-CDH 水溶液 0.05 ml  
を混合し、30 °C で反応させ、反応開始後 1 分間の 340 nm における吸光度の増加を測定する。

対照として上記組成でコレステロールの代りに水を用い同様の操作を行ない、対照液の 340 nm における吸光度の増加を試験液のそれから差し引く。得られた値から NAD(P)H の生成量を求め、これより試料中の NAD(P)-CDH 活性を算出する。

酵素活性の表示は、PH 8.6、30 °C の条件下で 1 分間に 1 μmole の NAD(P)H を生成する酵素を 1 単位とした。

次に本発明に使用する NAD(P)-CDH の作用を示す。



本発明における NAD(P)-CDH は全てこの反

応を触媒する。

以下に本発明に使用する NAD(P)-CDH の一般的性質をノカルジア sp. No Ch 2-1 (*Nocardia* sp. No Ch 2-1) FERM-P6217 およびアルカリゲネス sp. No 4 (*Alcaligenes* sp. No 4) FERM-P6216 の生産するものについて示す。

(1) ノカルジア sp. No Ch 2-1 (*Nocardia* sp. No Ch 2-1) FERM-P6217 の生産する NAD(P)-CDH

1) 至適 PH

第 1 図に 30 °C における PH と活性の関係を示した。

2) PH 安定性

第 2 図に 37 °C における PH と安定性の関係を示した。

3) 至適温度

第 3 図に PH 8.6 における温度と活性の関係を示した。

4) 熱安定性

第 4 図に PH 7.0 における温度と安定性の

関係を示した。

### 5) 基質特異性

本 素は、 $3\beta$ 位に水酸基をもつステロイドに反応し、コレステロールを100とする  
とスティグマステロール35、 $\beta$ -シトステロール25、その他デヒドロエピアンドロステロン、エルゴステロール等にわずかに作用する。

### 6) 補 素

NADを要求する。

(2) アルカリゲネス sp. No.4 (Alcaligenes sp. No.4) FERM-P6216の生産するNAD(P)-CDH

#### 1) 至適PH

第5図に30°CにおけるPHと活性の関係を示した。

#### 2) PH安定性

第6図に37°CにおけるPHと安定性の関係を示した。

#### 3) 至適温度

第7図にPH8.6における温度と活性の関係を示した。

### 4) 熱安定性

第8図にPH7.0における温度と安定性の関係を示した。

### 5) 基質特異性

本 素は $3\beta$ 位に水酸基をもつステロイドに反応し、コレステロールを100とする  
 $\beta$ -シトステロール36、ステグマステロール20、その他、デヒドロエピアンドロステロン、エルゴステロール等にわずかに作用する。

### 6) 補 素

NADを要求する。

次に本発明のNAD(P)-CDHを使用したコレステロールの定量について詳述する。

コレステロールを定量する場合、実際には緩衝液、NAD(P)、基質(血清、コレステロール等)及び、NAD(P)-CDHを混合し、一定時間反応し、生成するNAD(P)Hの増加を吸光度340nm

で測定する。また必要に応じて、生成したNAD(P)Hの水素をフェナジンメソサルフェート(PMS)、ジアフ・ラーゼ等により、ホルマザン色素等の発色系に導くことも可能である。さらには、反応系にコレステロールエステラーゼ、界面活性剤及び、安定化剤等の添加も可能である。反応時のPH<sup>16</sup>7.0～10の範囲で実施できるが、優れているPH範囲は7～9である。

次にNAD(P)-CDHによるコレステロール定量用試薬の量的組成についての1例を述べれば、反応系3ml当たり、NAD(P)-CDH 0.1～10単位、NAD(P)-10～100mM、トリトンX-100 1.0%以下、コレステロールエステラーゼ(ベーリンガー社製)0.1～10単位が有利である。しかし本発明はこれらの量的組成に限定されるものではない。本発明の測定法における特別な利点は生成するNAD(P)Hを直接測定できることであり、また完全に定量できることである。

次に試験例及び実施例につき述べる。

### 試験例

本発明における菌株3種につき、コレステロール5g/l、肉エキス5g/l、酵母エキス0.2g/l、少量の消泡剤の組成よりなる培地(PH7.2)100mlを入れた500ml斜面ロラスコに植菌し、30°Cで40時間振盪培養した。培養液50mlを遠心分離(8000rpm 10分間)により集菌し、0.1Mリン酸緩衝液PH7.0、50mlで洗浄した。

次に同じ緩衝液50mlに菌体を懸濁し、超音波にて菌体を破碎した。この破碎液を遠心分離(10000rpm、10分間)し、清澄液を得た。得られた清澄液のNAD(P)-CDH活性を測定し次の結果を得た。

| 菌株                                           | 培養液100ml当の活性 |
|----------------------------------------------|--------------|
| <i>Nocardia</i> sp. No Ch 2-1<br>FERM-PN6217 | 5.4 単位       |
| <i>Alcaligenes</i> sp. No 4<br>FERM-PN6216   | 2.3 単位       |
| <i>Proteus vulgaris</i><br>IAM1025           | 1.1 単位       |

## 実施例 1

*Nocardia* sp. Ch 2-1 FERM-PN6217 をグルコース 5g/l、肉エキス 5g/l、酵母エキス 0.2g/l、少量の消泡剤の組成よりなる培地 (PH 7.2)、200mlを入れた 500ml 容坂ロフラスコに植菌し、30°Cで 24 時間振盪培養する。この種培養液をコレステロール 5g/l、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g/l、消泡剤 0.5g/l の組成よりなる培地 (PH 7.2) 20mlを入れた 30ml 容ジャーファーメンターに植菌し、30°Cで通気、攪拌 (0.5 v/v/min、200 rpm) しながら 40 時間培養した。培養液を遠心分離し、得られた菌体を 0.1M リン酸緩衝液 PH 7.0 に懸濁し、ガラスゼーズにより菌体を破碎した。この菌体破碎液を遠心分離 (1000 rpm、10 分間) し、清澄な菌体抽出液を得た。得られた清澄液に硫酸アンモニウムを 35%飽和になるように加え酵素を沈澱せしめた。

沈澱を遠心分離 (8000 rpm、10 分間) で集め 20mM リン酸緩衝液 PH 7.0、100ml に溶かし、セロファンチューブで、20mM リン酸緩衝液 PH 7.0 に対して 24 時間透析した。

次に得られた透析液を 20mM リン酸緩衝液 PH 7.0 で平衡化した。DEAE・セルロース 200ml を充填したカラムに通し、酵素を吸着せしめた。同様の緩衝液でカラムを洗浄後、緩衝液濃度を 0.1M に上げて NAD(P)-CDH を溶出した。NAD(P)-CDH を含む両分を集め、これを濃縮後 20mM リン酸緩衝液 PH 7.0 に対して透析した。これを同様の緩衝液で平衡化したヘキシルセファーロース 20ml を充填したカラムに通し、吸着せしめた。このカラムを 20mM リン酸緩衝液 PH 7.0 で洗浄した。次に 0.5M NaCl を含む同様の緩衝液で NAD(P)-CDH を溶出し、活性画分を集め、濃縮し、50 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液 5.0ml を得た。全体の活性収率は 30% であった。

## 実施例 2

*Alcaligenes* sp. No 4 FERM-PN6216 をコレステロール 10g/l、グリセロール 2g/l、コーンスチーブリカー 5g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5g/l、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g/l、消泡剤 0.5g/l の組成よりなる培地 (PH 7.2) 20ml を入れた 30ml 容ジャーファーメンターに植菌し、30°Cで通気、攪拌 (0.5 v/v/min、200 rpm) しながら、72 時間培養した。この培養液を遠心分離 (8000 rpm、10 分間) 除菌した。得られた培養液に、硫酸アンモニウムを 40% 饱和になるように加え酵素を沈澱せしめた。

沈澱を遠心分離 (8000 rpm、10 分間) で集め、20mM リン酸緩衝液 PH 7.0、100ml に溶かし、セロファンチューブで、20mM リン酸緩衝液 PH 7.0 に対して 24 時間透析した。

次に実施例 1～実施例 3 に準ずる方法で精製を行ない、30 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液を 3.2ml 得た。全体の活性収率は 32% であった。

## 実施例 3

*Proteus vulgaris* IAM1025 を用い、実施例 1 に準ずる操作を行ない、37 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液 4ml を得た。全体の活性収率は 52% であった。

## 実施例 4

*Nocardia* sp. No Ch 2-1 FERM-PN6217 をグルコース 5g/l、肉エキス、酵母エキス 0.2ml、少量の消泡剤の組成よりなる培地 (PH 7.2)

## 実施例 5

*Alcaligenes* sp. No 4 FERM-PNo6216を用い、実施4に準ずる操作を行ない、25単位/mlのNAD(P)-CDH溶液を4.2mlを得た。全体の活性収率は38%であった。

## 実施例 6

*Proteus vulgaris* IAM1025を用い、実施例4に準ずる操作を行ない、18単位/mlのNAD(P)-CDH溶液を3.5ml得た。全体の活性収率は49%であった。

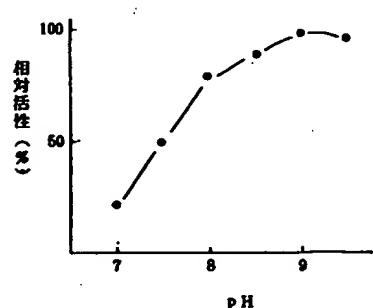
## 4 図面の簡単な説明

第1図はノカルジア sp. No Ch2-1 FERM-PNo6217の生産するNAD(P)-CDHの30°Cにおける至適PHを示す図であり、第2図は本NAD(P)-CDHの37°CにおけるPH安定性を示す図であり、第3図は本NAD(P)-CDHの至適温度を示す図であり、第4図は本NAD(P)-CDHの熱安定性を示す図である。

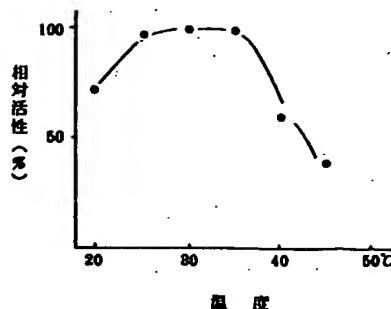
第5図はアルカリゲネス sp. No 4 FERM-PNo6216の生産するNAD(P)-CDHの30°Cに

おける至適PHを示す図であり、第6図は本NAD(P)-CDHの37°CにおけるPH安定性を示す図であり、第7図は本NAD(P)-CDHの至適温度を示す図であり、第8図は本NAD(P)-CDHの熱安定性を示す図である。

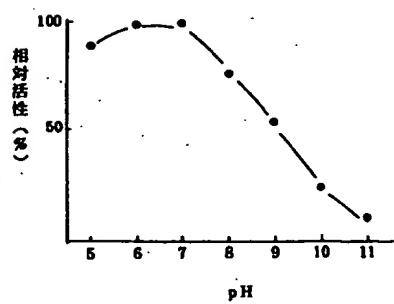
第1図



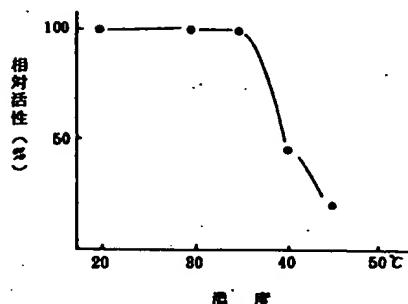
第3図



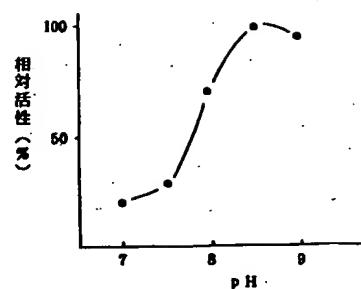
第2図



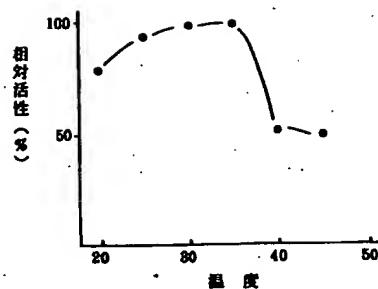
第4図



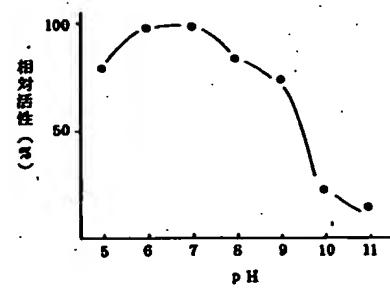
第5図



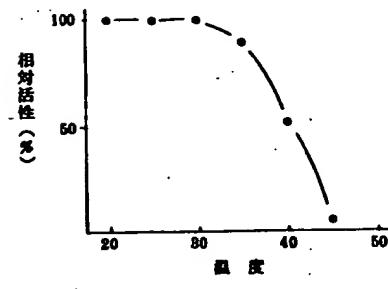
第7図



第6図



第8図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.